

제주산 식물을 이용한 생리 활성 검색

정 덕 상, 김 봉 석, 이 정 아, 양 원 혁

제주대학교 화학과

요 약

제주에서 자생하는 식물들의 추출물의 기능성 화장품과 관련한 라디칼 소거능과 NO억제활성, HL-60 cell을 이용한 항암활성 등의 생리 활성효과를 확인하여 보았다. 그 결과 몇 개의 분획에서 강한 저해활성효과를 나타내는 것을 확인 할 수 있었다.

주요어 : Radical Scavenging, Anti-inflammatory, Antitumor

인류 문명의 발달과 더불어 각종 의학기술의 발전은 인간의 건강을 유지시키는 동시에 수명 연장을 가능케 하였다. 인간은 수명이 연장되면서 노령 인구가 증가함에 따라 노화, 암, 동맥경화, 당뇨병 등의 성인병에 대해 관심을 갖게 되었다. 특히, 노화의 원인 중 하나는 산소에 의한 것인데, 산소는 호흡을 통하여 에너지를 체내에 공급하도록 하는 등 생명 현상에 있어서 중요한 역할을 담당하고 있지만 활성산소(free radical)가 인체 내에서 과도하게 생성되면 생체에 치명적인 산소독성을 일으키는 양면성을 가지고 있다. 즉 활성산소는 가장 바깥 전자껍질에 홀 전자(unpaired electron)를 가지고 있는 매우 반응성이 큰 화학종으로, 생리적 과정에서 뿐만 아니라 효소촉매반응의 중간물질로서 중요한 역할을 하고 있다. 그러나 활성산소의 큰 반응성 때문에 세포성분을 무차별적으로 공격하여 노화는 물론 암을 비롯하여 뇌질환, 심장질환, 동맥경화, 염증 등의 각종 질병을 일으키는 것으로 알려져 있다^{1,2,3)}.

또한 최근에는 피부 노화에 대한 관심도 커지고 있는데, 피부 노화 역시 활성산소가 관여하고 있다고 보고되어 있다^{1,2,3)}.

따라서 활성산소의 작용을 중화시키고 산소를 사용하는 생명체에서 활성산소에 의한 손상과 활성산

소가 아닌 산소에 의한 지질, 단백질, 핵산, 탄수화물의 손상을 차단하거나 억제하고 지연시키는 항산화제에 대한 연구가 지속적으로 진행되고 있으며, 최근에는 합성항산화제에 대한 생체 내에서의 안정성 때문에 노화방지, 성인병, 암, 염증 예방 등에 효과가 있는 천연 항산화제에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있다^{1,2,3)}.

본 연구는 제주에서 자생하는 식물들을 이용하여 DPPH법을 이용한 항산화 활성, MTT법을 이용한 항암 활성 및 NO assay법을 이용한 항염 활성 등을 조사 하여 보았다.

재료 및 방법

시료 및 시약

본 실험에 사용된 시료는 제주산 자생식물들로서 2002년 3월부터 2003년 10월 사이에 제주도 북제주군 조천읍 선흘리 및 제주시 아라동에서 채취하여 제주대학교 생물학과 식물분류학 실험실에서 동정하였다. 채집된 시료는 세척 통풍 건조한 후 세절하여 분쇄하여 냉장 보관하면서 사용하였다. 그리고 건조분말을 80% MeOH로 추출하였다. 본 실험에서 시료의 추출에 사용된 용매들은 Merck, Junsei

및 Hyman Co.의 제품을 사용하였다. 항산화 활성 측정시 사용한 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl(DPPH)은 Aldrich Co.의 제품을 사용하였고 자외선 분광광도계는 Hewlett Packard 8453을 사용하였다. 또한, Murine macrophage cell line 인 RAW 264.7 세포는 Korean cell Line Bank(KCLB)로부터 분양받아 사용하였고, Lipopolysaccharide(LPS, E.coli sero type 0111:B4)는 Sigma(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하여 사용하였으며, 항암 활성 실험에서는 전골수성 백혈병 환자에서 유래한 HL-60 세포주를 한국 세포주 은행(KCLB)으로부터 분양받아 사용하였다.

시료 추출물의 제조

건조 시료 1 kg을 메탄올 4 L에 넣고 60일간 암냉소에 보관하여 침출시켰다. 용액은 여과하여 잔사를 제거하고 회전농축증발기로 감압 하에서 용매를 증발 농축하여 메탄올 추출물(MeOH extracts)을 얻었다. 이 농축액 적당량(농축액 무게 대비 5배)의 Hexane을 가하여 추출한 후 잔사를 제거하고 농축하여 Hexane 분획을 얻었다. 이어 동일한 방법으로 EtOAc를 가하여 추출한 후 농축하여 EtOAc 분획을 얻었고, 다음으로 1 L의 BuOH를 가하여 추출한 후 잔사를 제거하고 농축하여 BuOH 분획을 얻었으며 이들 용매분획들을 이용하여 실험을 실시하였다.

라디칼 소거 활성 측정⁴⁵⁾

1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH, Aldrich) 약 2 mg을 에탄올 15 ml에 녹여 DPPH용액을 제조하였다. 이용액 200 μ l에 DMSO(Dimethyl sulfoxide) 500 μ l와 EtOH 3000 μ l를 첨가시키고 준비된 용액을 UV-Visible spectrophotometer를 이용하여 517 nm의 파장에서 대조군의 흡광도가 0.94 - 0.97이 되도록 적당량의 에탄올을 첨가하면서 조정하였다. 실험에 사용할 농축된 시료 1 mg에 메탄올 1 ml를 섞은 후 충분히 녹이고 준비된 DPPH용액 450 μ l에 시료용액 50 μ l 넣어 잘 섞은 후 실온에서 10분 동안 방치하였다가 517 nm에서 흡광도를 측정하였다.

항암 활성 측정⁴⁶⁾

RAW264.7 세포를 DMEM 배지를 이용하여 1.5×10^5

cells/ml로 조절한 후 24 well plate에 접종하고, 시험물질과 LPS(1μ g/ml)를 함유한 새로운 배지를 동시에 처리하여 24시간 배양하였다. 생성된 NO의 양은 Griess 시약을 이용하여 세포배양액 중에 존재하는 NO₂의 형태로 측정하였다. 세포배양 상등액 100 μ l와 Griess 시약[1%(w/v) sulfanilamide, 0.1%(w/v) naphylethylenediamine in 2.5F%(v/v) phosphoric acid] 100 μ l를 혼합하여 96 well plate에서 10분 동안 반응시킨 후 ELISA reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

암세포 증식 억제 효과 측정⁴⁷⁾

전골수성 백혈병 환자에서 유래한 HL-60 세포주를 100 units/ml의 penicillin-streptomycin과 10%의 fetal bovine serum(FBS)가 함유된 RPMI 1640 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ 항온기에서 배양하였으며, 계대 배양은 3-4일에 한번씩 시행하여 세포를 배양하였다.

세포의 대사활성 측정은 HL-60 세포를 3.2×10^5 cells/ml의 농도로 96 well plate의 각 well에 넣고, 시료를 100 μ g/ml의 농도로 첨가하였다. 이를 4일간 배양 한 다음, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazoliumbromide(MTT) 110 μ g을 첨가하고 4시간 동안 더 배양하였다. Plate를 1000 rpm에서 10분간 원심분리하고 조심스럽게 배지를 제거한 다음, dimethylsulfoxide 150 μ l를 가하여 MTT의 환원에 의해 생성된 formazan 침전물을 용해시킨 후 microplate reader를 사용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 시료 군에 대한 평균 흡광도 값을 구하였으며, 대조군의 흡광도 값과 비교하여 성장억제정도를 조사하였다.

결과 및 고찰

본 연구에 사용된 시료는 제주산 자생식물들로서 메탄올 추출물을 사용하였고 임의적으로 선택하여 용매분획한 후 생리활성을 검색하였다.

라디칼 소거 활성

모든 생물의 생명유지에 있어 절대적으로 필요한

산소는 안정한 분자상태인 바닥상태 삼중항 산소 (ground state triplet oxygen)가 체내 효소계, 환원 대사, 화학약품, 공해물질, 광화학반응 등 각종 물리적, 화학적 요인 등에 의하여 반응성이 매우 큰 활성 산소($O_2^{\cdot-}$, $\cdot OH$, H_2O_2 , $\cdot OOR$)가 된다. 현재 오존층의 파괴로 인한 환경 변화에 의해서, 지표에 도달하는 자외선의 양은 점점 증가되고 있다. 피부는 자외선의 영향을 가장 받기 쉬운 기관이다 따라서, 활성 산소종으로 유도된 피부의 광산화적 손상 위험이 실질적으로 증가하고 있다. 피부는 자외선에 노출되어 있어 활성 산소종을 만드는 광화학적 반응들이 계속해서 일어나고 있다. 활성 산소종은 노화, 특히 피부노화의 원인 물질로 작용하여 피부 세포와 조직 손상을 주도한다. 이에 따라 피부 노화를 억제 시키는데 천연물의 역할이 매우 중요하다⁹⁾. 이러한 천연 항산화제의 검색 방법 중 DPPH는 약품이나 식품의 free radical 소거활성을 측정하는데 주로 이용되고 있다. DPPH는 free radical이 존재할 때는 적색을 나타낸다. 그러나 radical이 모두 소모되면 황색으로 변하게 되는데 이때 spectroscopy에 의해 517 nm에서 흡광도를 측정하였다.

메탄을 추출물을 이용하여 DPPH 활성을 측정한 결과를 Table 1에 ascorbic acid(96%)을 대조군으로 하여 %값으로 나타내었다. 실험 결과 큰 천남성의 잎(44.54%)과 싸리(44.08%)에서 미약하게나마 라디칼 소거 활성을 보이고 있음을 확인하였다.

항염 활성 측정

NO(nitro oxide)는 L-Arginine으로부터 NOS(nitric oxide synthase)에 의해 생성되는 가스 형태의 무기 유리기(inorganic, free radical)로 오래전에는 단순히 독성 물질로만 알려져 있었지만 1987년 이후 NO가 인체 내에서 중요한 역할을 담당하는 물질로 알려지면서, 항암 및 항균작용, 혈관 확장작용, 신경전달 물질 등의 대표적인 기능 이외에도 다양한 다른 기능이 있음이 밝혀지게 되었다. 최근에는 류마티스 관절염과 같은 염증성 관절염의 조직 손상에 NO가 중요한 역할을 담당한다는 보고가 있다^{9,10, 11)}.

최근 염증 유발에 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 nitric oxide(NO) 생성에 대한 효과를 알아보기 위해 RAW 264.7 세포에 LPS(1 $\mu g/ml$)와 자생식물 분획물을 처리 하였다. 생성된 NO의 양은

Table 1. DPPH radical scavenging of methanol extracts

Plants	DPPH Inhibition(%)
큰천남성 (<i>Arisaema ringens</i> (Thunberg) Schott) - 잎	44.54
큰천남성 (<i>Arisaema ringens</i> (Thunberg) Schott) - 줄기	14.9
큰천남성 (<i>Arisaema ringens</i> (Thunberg) Schott) - 꽃	19.58
큰천남성 (<i>Arisaema ringens</i> (Thunberg) Schott) - 뿌리	13.6
싸리 (<i>Lespedeza bicolor</i> Turczaninov)	44.08

※ DPPH(%) : Ascorbic acid (control) = 96%

Table 2. Effects of methanol extracts on nitrite accumulation in RAW264.7 macrophages

Plants	NO Inhibition(%)
복수초 (<i>Adonis amurensis</i> Regel et Radde.) - 뿌리	0.77
큰천남성 (<i>Arisaema ringens</i> (Thunberg) Schott) - 줄기	25.92
큰천남성 (<i>Arisaema ringens</i> (Thunberg) Schott) - 꽃	N.D
큰천남성 (<i>Arisaema ringens</i> (Thunberg) Schott) - 뿌리	N.D
자주피불 주머니(<i>Corydalis incisa</i> (Thunberg) Pers.) - 뿌리	1.54
박새 (<i>Veeatrum oxyspalum</i> Turcz) - 뿌리	2.84
미국미역취 (<i>Solidago serotina</i> Ait.) - 뿌리	0.64
귀퉁나무 (<i>Ligustrum obtusifolium</i> Sieb et Zucc.) - 열매	2.62

N.D = Not Detect

Griess 시약을 이용하여 세포 배양액 중에 존재하는 NO₂⁻의 형태를 측정하였다.

메탄을 추출물에 대한 NO의 생성 억제 결과는 Table 2에서 나타낸 것 같다. NO의 생성 정도를 %로 나타내었으며, 본 연구에서는 50%이상이 되는 값을 나타내었을 때 활성이 있다고 판단하였다. 이에 메탄을 추출물에서는 실험 식물들이 활성을 거의 나타내지 않았지만 Table 3에서 나타나는 바와 같이 큰천남성인 경우에 용매분획에서 우수한 활성을 나타냄을 확인 할 수 있었다. 큰천남성의 잎인 경우에는 Hexane 분획과 EtOAc 분획에서 각각 92.50%와 82.72%의 우수한 활성을 보였으며 큰천남성의 꽃인 경우에는 Hexane 분획과 EtOAc 분획에서 각각 68.19%와 96.35%로 우수한 활성을 확인하였다. 그리고 자주괴불주머니의 Hexane 분획에서 54.85%의 활성을 보임을 확인하였다. 용매분획에 대한 활성 검색 결과 Hexane 분획과 EtOAc 분획에서 활성을 나타내는 것으로 보아 비극성이거나 비교적 극성이 낮은 물질을 포함하고 있는 것으로 판단된다.

암세포 증식 억제 효과 측정

현재 항암제를 탐색하는 다양한 방법들이 사용되어 지고 있다. 가장 직접적이고 이상적인 방법은 세포에 trypan blue 등을 처리한 후 현미경과 hemocytometer를 이용하여 살아있는 세포를 세는 것이지만 시간과 너무 많은 노력이 요구되므로 검체수가 많을 경우에는 사용할 수가 없기 때문에 세

포의 살아있는 정도를 간접적으로 측정하려는 여러 가지 방법들이 개발되어 왔다. MTT 검사법은 항암제의 감수성에 대한 1차 선별검사의 목적으로 많이 사용되지만, 성장인자에 대한 세포의 감수성 실험 등에도 대단히 유용하게 사용될 수 있다.

MTT assay는 탈수소 효소작용에 의하여 노란색의 수용성 기질인 MTT tetrazolium을 청자색을 띠는 비수용성의 MTT formazan (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide)으로 환원시키는 미토콘드리아의 능력을 이용하는 검사법이다. MTT formazan의 흡광도는 540 nm의 파장에서 최대가 되며, 이 파장에서 측정된 흡광도는 살아있고 대사가 왕성한 세포의 농도를 반영한다. 그러나 측정할 well의 세포의 농도가 너무 낮거나 높은 범위에 있으면 살아있는 세포의 농도와 흡광도 사이의 직선적인 비례관계가 성립되지 않게 되므로 최적의 세포농도를 결정하는 과정을 거쳐야 한다. 항암약제를 세포 배양배지에 투여한 후 배양한 암세포는 약제의 농도에 따라서 항암제를 투여하지 않고 순수한 배지에서 배양한 암세포에 비해 생존세포의 비율이 감소한다. 그 감소되는 비율은 약제의 종류, 약제에 대한 암세포의 감수성과 약제의 농도에 따라 달라지며, 사멸되지 않고 대사적 활성이 있는 세포는 흡광도를 측정함으로써 간접적으로 알 수 있다. 약제에 대한 감수성은 약제를 처리하지 않은 well의 흡광도에 대한 약제처리 well에서의 백분율로 비교하였다.

본 실험에 식물 추출물들은 crude한 상태임을 감

Table 3. Effects of solvent extracts on nitrite accumulation in RAW264.7 macrophages

Plants	layer	NO Inhibition(%)
큰천남성 - 잎 (<i>Arisaema ringens</i> (Thunberg) Schott)	Hexane	92.50
	EtOAc	82.72
	BuOH	N.D
큰천남성 - 꽃 (<i>Arisaema ringens</i> (Thunberg) Schott)	Hexane	68.19
	EtOAc	96.35
	BuOH	11.86
자주괴불주머니 (<i>Corydalis incisa</i> (Thunberg)Pers.)	Hexane	54.85
	BuOH	48.03
박새 (<i>Veeatrum oxysepalum</i> Turcz)	Hexane	8.30
	EtOAc	*

* = cytotoxicity ; N.D = Not Detect

Table 4. Inhibitory effect of methanol extracts on the growth of HL-60 cells

Plants	NO Inhibition(%)
복수초 (<i>Adonis amurensis</i> Regel et Radde.) - 뿌리	88.87
큰천남성 (<i>Arisaema ringens</i> (Thunberg) Schott) - 잎	6.30
큰천남성 (<i>Arisaema ringens</i> (Thunberg) Schott) - 꽃	4.65
큰천남성 (<i>Arisaema ringens</i> (Thunberg) Schott) - 뿌리	N.D
자주괴불 주머니 (<i>Corydalis incisa</i> (Thunberg)Pers.) - 뿌리	52.13
박새 (<i>Veeatrum oxyspalum</i> Turcz)	87.89
위릉채 (<i>Potentilla chinensis</i> Seringe)	2.33
싸리 (<i>Lespedeza bicolor</i> Turczaninov.)	1.38

N.D = Not Detect

안하여 MTT inhibition (%)값이 60%이상인 되는 것을 활성이 있다고 판단하였다. 이에 본 실험의 MTT assay의 결과는 Table 4와 같다.

메탄을 추출물인 경우(Table 4) 복수초 뿌리(88.87%), 박새(98.89%)에서 우수한 활성을 보임을 확인하였다.

이용한 몇 가지 시료의 용매분획에서 항산화, 항염 및 항암활성에 효과가 있는 것으로 나타났다. 따라서 본 연구결과는 제주산 식물을 이용한 의약품, 기능성 화장품, 식품, 천연 보존료 등의 관련분야에의 활용 및 유효 성분의 분리·동정의 기초 자료로써 이용될 수 있으리라 생각된다.

결 론

본 연구는 제주산 자생식물에 대하여 항산화 활성, 항암 활성 및 항염 활성 등을 실시하였다.

항산화 활성은 DPPH법을 이용하여 측정하였다. 본 연구에 사용된 식물의 추출물에서는 라디칼 소거능력이 우수한 식물은 확인되지 않았다. 항염 활성의 경우에는 메탄을 추출물에서는 우수한 활성 식물은 확인되지 않았으나 용매분획을 실시하여 항염을 측정된 식물 중에서 큰천남성 잎의 Hexane 분획과 EtOAc 분획, 큰천남성 꽃의 Hexane 분획과 EtOAc 분획, 그리고 자주괴불주머니의 Hexane 분획에서 우수한 활성을 보였다. 또한 MTT법을 이용한 항암 활성인 경우에는 메탄을 추출물인 복수초 뿌리, 박새에서 우수한 활성을 보임을 확인하였다.

항염 활성 측정에서 알 수 있듯이 메탄을 추출물에서 활성을 보이지 않았거나 그 활성 정도가 미약하다 하더라도 용매분획을 통하여 그 활성 정도가 높아질 수 있기 때문에 용매분획을 시행하지 않은 식물에 대해서는 용매분획을 통하여 활성물질을 추적 할 수 있을 것이라 판단된다.

이상의 연구 결과를 보면, 제주의 자생 식물을

참고 문헌

1. Kang, M. H., Ryu S. N., Min, K. S., Kim, K. S., Bang, J. K., Lee, B. H. (1999) Current Research Activities of Antioxidative Compound in Plants. *Kor. J. Intl. Agri.* 11(2) : 207-215.
2. Ryu S. N., Lee, B. H. (1998) Antioxidative Components in Higher Plants and Their Researches in Japan and U S. *Kor. J. Intl. Agri* 10(2): 13-23
3. 김종평, 유익동 (1998) 노화억제를 위한 항산화제 연구. *생명공학동향*, 제6권 제2호
4. Blois, M S. (1958) Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature*. 181: 1199-1200.
5. Ryu, G., Park, E.K., Joo, J.H., Lee, B.H., Choi, B.W, Jung, D.S. and Lee, N.H., (2001) A new antioxidant monoterpene glycoside, α -benzoyloxypaeoniflorin from paeonia suffruticosa. *Arch. Pharm.res.*24 : 105-108.
6. Cho, J.Y., Nam, K.H., Kim, A.R., Bark, J.S., Yoo, E.S., Baik, K.U., Yu, Y.H., Park, M.H.

- (2001) In-vitro and in-vivo immunomodulatory effects of syringin. *Pharmacy and Pharmacology*. 53: 1287-1297.
7. Sang chul Kim. Soo Young Park. Kyu Kee Her. Se Jae Kim. Hee Kyoung Kang. (2001) Effect of extracts of *Trichosanthes kirilpwii* var. *japonica* on the growth of HL-60 leukemia cells. *Cheju journal of Life Science*. 4(4): 95-102
8. 박수남. (1999). 피부노화와 활성산소. 서울산업대학교 논문집 제50권. 329-341.
9. Moncada S. Palmer R.M.J. Higgs EA.(1991) Nitric oxide. *Physiology. Pathophysiology and pharmacology*. Pharmacol Rev 43: 109.
10. Lowenstein CJ. Snyder SH. (1992) nitric oxide. a novel biologic messenger. *cell* 70: 705. 1992
11. Kim. T. H., Jun. J. B., Jung. S. S., Lee. I.H., Yoo. D. H., Kim. S. Y., Lee. E. Y., Chang. S. Y. (1997) Nitric Oxide (NO) in Inflammatory Arthrit. *대한내과학지*. 52(2): 32-41